ESTUDO DA PROTEÍNA TIORREDOXINA NA RESPOSTA AO ESTRESSE OXIDATIVO EM *Paracoccidioides brasiliensis*

LIMA, Yanna Andressa Ramos¹; DOMINGOS, Fernanda de Castro²; JESUÍNO, Rosália Santos Amorim³

Palavras-chave: *Paracoccidioides brasiliensis*, estresse oxidativo, tiorredoxina

1. INTRODUÇÃO

Paracoccidioides brasiliensis é o agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM) uma das mais prevalentes micoses sistêmicas na América Latina. Trata-se de um fungo termodimórfico que transita entre a forma miceliana saprófita à temperatura ambiente e a forma leveduriforme parasitária à temperatura do hospedeiro mamífero. Para o estabelecimento da PCM o fungo *P. brasiliensis* tem que interagir com um ambiente hostil, que corresponde à resposta do sistema imune do hospedeiro com alta produção de EROS, e para isso desenvolveu mecanismos contra os danos oxidativos, o que inclui a síntese de enzimas antioxidantes. A tiorredoxina (TRX) é uma proteína pequena (~12 KDa) contendo um sítio ativo conservado Cys-Gly-Pro-Cys, é reduzida pela TRX redutase e está envolvida na defesa antioxidante, redução de ribonucleotídeos e a redução de peroxidases e fatores de transcrição [1].

Considerando que a sobrevivência do fungo no hospedeiro é um fator essencial para o estabelecimento da infecção, o estudo da TRX na resposta ao estresse oxidativo em *P. brasiliensis* permitirá um maior entendimento no que diz respeito ao processo de adaptação do fungo no hospedeiro. O presente trabalho tem como objetivo o estudo e análise da expressão da TRX sob condições normais de cultivo e sob estresse térmico e oxidativo, e a comparação da sequência de aminoácidos da TRX de *P. brasiliensis* (*PbTRX*) com sequências de outros organismos existentes em banco de dados para a definição de motivos e construção de árvore filogenética.

2. METODOLOGIA

2.1 – Análises de homologia e árvore filogenética.

A sequência de aminoácidos da *PbTRX* (nº de acesso GenBank AAQ84040) foi comparada com as sequências de outros organismos obtidas em banco de dados através do programa BLAST [2]. As sequências foram alinhadas pelo programa CLUSTAL X [3] e a árvore filogenética foi produzida pelo programa Tree View [4].

2.2 – Cultivo do fungo

Foi utilizado o isolado *Pb01* (coleção ATCC, MYA, 826) do fungo *P. brasiliensis* cultivado em meio Fava-Neto em estufa a 26°C para a forma de micélio e 37°C para a forma de levedura.

2.3 – Análise do crescimento de células leveduriformes de *P. brasiliensis* em condições de estresse oxidativo

Foi utilizado um grupo controle cultivado em condições normais e um grupo tratado com 25 mM do agente oxidante H₂O₂. Os dois grupos foram submetidos a uma suave rotação a 37°C por 3 horas, ao que se seguiu a padronização do inóculo em 1x10⁶ células/mL de meio (YPD). As células dos dois grupos foram contadas em Câmara de Neubauer por 7 dias e a média das contagens de quatro experimentos, sendo feito triplicata para o grupo controle e tratado em cada um desses experimentos, foi utilizada para a construção de uma curva de crescimento.

2.4 – Eletroforese de proteínas e *Western blotting*

As células micelianas e leveduriformes de *P. brasiliensis* submetidas ao estresse térmico por inversão da temperatura normal a cada tipo de célula e as células leveduriformes de *P. brasiliensis* cultivadas em condições normais e de estresse oxidativo como citado anteriormente foram submetidas à extração de proteínas. Os extratos protéicos foram

fracionados por eletroforese unidimensional [5] e bidimensional [6]. Em seguida as proteínas foram coradas por azul de Coomassie ou transferidas para membranas de nitrocelulose para a realização do *Western blotting* segundo [7] utilizando o anticorpo primário anti-TRX de *E. coli* (Sigma) e o anticorpo secundário anti-IgG de coelho acoplado à fosfatase alcalina. As membranas foram reveladas pelo sistema BCIP/NBT.

2.5 – Extração do RNA total de *P. brasiliensis* e obtenção da sonda homóloga

As células micelianas e leveduriformes de *P. brasiliensis* foram submetidas à extração de RNA pelo método Trizol (GIBCO™ Invitrogen Corporation). A sonda homóloga foi obtida via PCR usando primers construídos com base na sequência 5' e 3' do cDNA da *Pbtrx1*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 – Análises de homologia e árvore filogenética

As análises realizadas permitiram identificar uma região de aminoácidos conservados em diferentes organismos, essa região corresponde ao sítio ativo das TRXs. A *PbTRX* demonstrou maior identidade e similaridade com a sequência do organismo também pertencente ao Reino Fungi *Saccharomyces cerevisiae*, apresentando 57% de identidade e 76% de similaridade. A análise filogenética demonstra a ampla distribuição da TRX entre os organismos, estando presente em organismos procarióticos e eucarióticos. A *PbTRX* aparece na árvore filogenética agrupada no clado dos fungos.

3.2 – Curva de crescimento.

A contagem das células leveduriformes de *P. brasiliensis* em Câmara de Neubauer mostrou que o grupo tratado apresentou menor capacidade de crescimento, no entanto a taxa de crescimento observada indica que o fungo possui mecanismos de defesa contra a situação de estresse ao qual foi submetido, mantendo-se viável. Podemos então sugerir que assim como acontece com outros organismos [8], as células leveduriformes de *P. brasiliensis* são resistentes ao tratamento com H₂O₂.

3.3 – Western blotting

A realização do *Western blotting* permitiu a visualização de uma banda na região correspondente à TRX (~12 KDa e pI~5,19), no entanto não foi possível determinar se houve ou não um aumento da expressão da *PbTRX* em condições de estresse. Nota-se que ela está sendo expressa tanto nas células em transição como nas células do grupo controle e tratado e isto é um indicativo do importante papel desta proteína em situações que expõem o fungo a algum tipo de estresse, seja ele térmico ou oxidativo. Esses dados serão confirmados pela utilização de anticorpo primário anti-*PbTRX* após a expressão e purificação da proteína recombinante em *E. coli* (experimentos em andamento).

4. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados mostraram que a proteína *PbTRX* é altamente conservada nos mais diversos organismos o que também é evidenciado nas análises de filogenia.

O comportamento das células leveduriformes de *P. brasiliensis* quando submetidas às condições de estresse oxidativo foi de acordo com o esperado o que corrobora com a afirmação de que o fungo é afetado de alguma forma pelos danos causados pela formação das EROS, da mesma forma a taxa de crescimento das células tratadas com o agente oxidante demonstra a capacidade do fungo em defender-se do estresse oxidativo.

A realização do *Western blotting* permitiu uma análise da expressão da *PbTRX* quando o fungo é submetido a situações de estresse, sendo expressa em todas as situações analisadas, tanto na diferenciação de micélio para levedura como na diferenciação de levedura para micélio. Resultado similar foi observado nas culturas controle e tratada com agente oxidante. Essas análises serão melhor evidenciadas pela realização do *Western blotting* com o anticorpo obtido após a expressão e purificação da proteína *PbTRX* recombinante.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Rahlfs, S.; Schirmer, R. H.; Becker, K. The thioredoxin system of *Plasmodium falciparum* and other parasites. *Cell Mol Life Sci.* 2002 Jun; **59(6)**:1024-41.
- [2] Altschul, S. F.; Madden, T. L.; Schaffer, A. A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997 Sep 1; **25(17)**:3389-402.
- [3] Thompson, J. D.; Gibson, T. J.; Plewniak, F.; Jeanmougin, F.; Higgins, D. G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 1997 Dec 15; **25(24)**:4876-82.
- [4] Page, R. D. M. TREEVIEW. An application to display phylogenetic trees on personal computers applications in the Biosciences. 1996; **12**:357-358.
- [5] Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970 Aug 15; **227(5259)**:680-5.
- [6] O'Farrel, P. H. Hight two dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 1975; **250**:4007-4021.
- [7] Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. *Molecular cloning: A laboratory manual.* Cold Spring Harbor, New York. 1989.
- [8] Jamieson, D. J. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 1998; **14**: 1511-1527.

FONTE DE FINANCIAMENTO – CNPq/PIBIC

¹ Bolsista de iniciação científica. Instituto de Ciências Biológicas - LBM - Laboratório de Biologia Molecular/UFG, yanna.lima@pop.com.br

² Mestranda. Instituto de Ciências Biológicas – LBM – Laboratório de Biologia Molecular/UFG, fercaastro@yahoo.com.br

³ Orientadora. Instituto de Ciências Biológicas – LBM – Laboratório de Biologia Molecular/UFG, rosalia@icb.ufg.br